

Rec'd PCT/PTO 522 175
24 JAN 2004

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
5 février 2004 (05.02.2004)

PCT

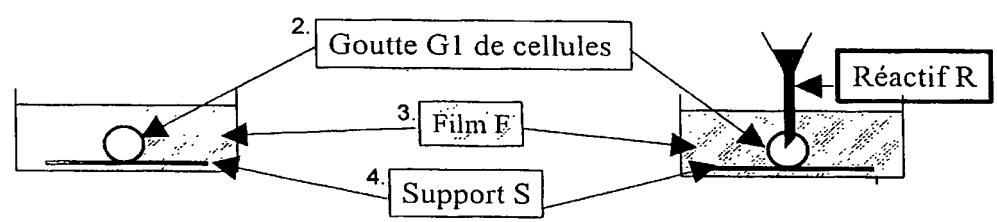
(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/011938 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/50
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002298
- (22) Date de dépôt international : 21 juillet 2003 (21.07.2003)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
02 09326 23 juillet 2002 (23.07.2002) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 PARIS (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :

- SCHAACK, Béatrice [FR/FR]; 17 rue Mozart, F-38000 GRENOBLE (FR). CHATELAIN, François [FR/FR]; 413 rue H. Berlioz, F-38170 LE CHEVALON DE VOREPPE (FR). FOUQUE, Brigitte [FR/FR]; 3 avenue A. Berges, F-38170 SEYSSINET (FR). FUCHS, Alexandra [FR/FR]; 2 rue Saint Robert, F-38120 SAINT EGREVE (FR). FOUILLET, Yves [FR/FR]; 17 chemin des carrières, F-38340 VOREPPE (FR).
- (74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES, 36 rue de Saint Petersburg, F-75008 PARIS (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Suite sur la page suivante]

- (54) Title: METHOD AND DEVICE FOR SCREENING MOLECULES IN CELLS
- (54) Titre : PROCEDE ET DISPOSITIF POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES DANS DES CELLULES



A. Goutte G1 sur support S B. Injection de réactif R dans G1

- 1...REAGENT R
2...DROP G1 OF CELLS
3...FILM F
4...SUPPORT S
A...DROP G1 ON SUPPORT S
B...INJECTION OF REAGENT R IN G1

(57) Abstract: The invention concerns a method for reacting a reagent R with a cell C, which consists in: setting the cell C on a support S comprising a substantially planar surface, in the form of an aqueous drop on said surface; covering the planar surface of the support S whereon the aqueous drop has been set containing the cell C with a separation film F, allowing through gases and preventing the aqueous drops set on the support S from evaporating, F being non-miscible with the reagent R; triggering the reaction between the reagent R and the cell C by introducing the reagent R in the aqueous drop containing the cell C. The invention also concerns a device for implementing said procedure and its applications.

[Suite sur la page suivante]

WO 2004/011938 A2

BEST AVAILABLE COPY



(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrége :** L'invention concerne un procédé de mise en réaction d'un réactif R avec une cellule C, dans lequel :- la cellule C est déposée sur un support S comportant une surface sensiblement plane, sous forme d'une goutte aqueuse sur ladite surface,- la surface plane du support S sur laquelle a été déposée la goutte aqueuse contenant la cellule C est recouverte par un film de séparation F, permettant le passage des gaz et empêchant l'évaporation des gouttes aqueuses déposées sur le support S, F étant non miscible avec le réactif R,- la réaction entre le réactif R et la cellule C est déclenchée par l'introduction du réactif R dans la goutte aqueuse contenant la cellule C.L'invention concerne également un dispositif pour la mise en uvre de ce procédé et ses utilisations.

PROCEDURE ET DISPOSITIF POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES DANS DES CELLULES

La présente invention est relative à un procédé et un dispositif permettant de mettre en œuvre des réactions sur une ou plusieurs cellules ou sur des
5 tissus de cellules ou des réseaux de cellules ou entre des cellules.

L'entrée de molécules dans la cellule représente une étape clef en biotechnologie. Le plus souvent, pour étudier cette étape, on doit cribler en parallèle, dans les mêmes conditions, les effets biologiques d'une famille de molécules. La
10 quantité croissante de séquences d'ADN et d'autres molécules disponibles pour être testées sur les cellules rend indispensable l'utilisation de procédés automatisés, ayant un caractère systématique et dotés de hauts rendements.

On connaît par le document WO01/07159 un dispositif permettant de réaliser des protocoles biochimiques en série dans des microréacteurs. Toutefois ce dispositif ne permet pas de travailler sur des cellules.

15 Le document WO95/34374 décrit un dispositif et un procédé permettant de réaliser des microréactions en série. Toutefois, ce dispositif et ce procédé n'envisagent pas de mettre en œuvre des réactions dites de transfection, dans lesquelles un réactif pénètre dans une cellule. En effet, la cellule est un organisme vivant, hétérogène, dont la survie et la mise en réaction requièrent des conditions
20 particulières, notamment en ce qui concerne les échanges gazeux. Ces paramètres ne sont pas pris en compte ni même envisagés dans ce document.

A l'heure actuelle, la plupart des méthodes de criblage de molécules ne permettent pas d'utiliser des cellules vivantes, elles sont réalisées avec des binômes de molécules isolées. Dans le cas des criblages mettant en jeu des cellules vivantes, les
25 molécules criblées pénètrent rarement dans les cellules, elles reconnaissent seulement des capteurs de surface, tels que par exemple des récepteurs.

Par exemple, la transfection de cellules par des familles d'ADN est faite actuellement dans des boîtes comportant des puits répartis sous forme de matrices. Ce procédé présente l'inconvénient de consommer d'importantes quantités de
30 réactif, de nécessiter des dispositifs lourds pour la détection des interactions moléculaires. En outre, les systèmes d'analyse de fluorescence en puits ont

l'inconvénient d'être d'une taille importante, la fluorescence propre des plaques à puits doit être prise en compte, l'analyse doit être faite puits par puits, sans vision globale de l'ensemble du dispositif

On connaît par J. Ziauddin *et al.*, Nature, 411, 107-110, 2001, un
5 procédé de transfection automatisé : on dépose de l'ADN sous forme d'une dispersion dans de la gélatine de façon matricielle sur une lame de verre. Après séchage, les emplacements comprenant l'ADN sont traités par un agent de transfection lipidique puis la plaque est placée dans un milieu dans lequel sont réparties des cellules. Sur la lame de verre, l'ADN gélatinisé est présent sous forme solide et la
10 transfection se fait en phase semi-solide en liant les molécules d'ADN à des lipides favorisant la pénétration de l'ADN dans les cellules adjacentes aux dépôts d'ADN. On obtient une matrice de cellules transfectées aux emplacements correspondant aux dépôts d'ADN. Toutefois cette méthode présente l'inconvénient d'être peu précise et non reproductible. L'accrochage par la gélatine ne permet pas de contrôler le
15 décrochage de l'ADN transfecté. Il ne permet pas non plus d'améliorer l'efficacité de la transfection. Par ce procédé l'expression ou le blocage de l'expression d'une quantité suffisante de protéine peut difficilement être obtenu. En outre, une seule sorte de cellule peut être utilisée pour chaque lame de verre.

Il subsiste donc le besoin d'une méthode de transfection, et plus
20 généralement de mise en réaction de composés avec des cellules biologiques, ladite méthode étant automatisable, utilisant des quantités minimales de réactifs et donnant des résultats reproductibles. En outre, on souhaite pouvoir mettre en série plusieurs réactions dans une même cellule, pouvoir travailler sur des systèmes cellulaires complexes (2 types de cellules différentes), sur des tissus ou sur des réseaux
25 cellulaires, et mettre en parallèle plusieurs systèmes cellulaires. On souhaite également que le génome des cellules utilisées puisse être préalablement modifié afin de préparer la détection des interactions moléculaires, par exemple par l'introduction de gènes de protéines fluorescentes.

L'invention a donc pour objet un procédé de mise en réaction d'un
30 réactif R avec au moins une cellule C, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la cellule C est déposée sur un support S comportant une surface sensiblement plane, sous forme d'une goutte aqueuse sur ladite surface ;

- la surface sensiblement plane du support S sur laquelle a été déposée la goutte aqueuse contenant la cellule C est recouverte par un film de séparation F, permettant le passage des gaz et empêchant l'évaporation des gouttes aqueuses déposées sur le support S, F étant non miscible avec le réactif R.

5 - la réaction entre le réactif R et la cellule C est déclenchée par l'introduction du réactif R dans la goutte aqueuse contenant la cellule C. Plusieurs variantes existent pour l'introduction du réactif R dans la cellule C :

 . Selon une première variante, une goutte aqueuse contenant la cellule C est déposée sur le support S, une seconde goutte aqueuse contenant le réactif R est injectée, à l'aide de tout moyen d'injection approprié, directement dans la goutte contenant la cellule C. Une telle variante est illustrée par la figure 1.

 . Selon une seconde variante, une première goutte aqueuse est déposée sur le support S puis une seconde goutte aqueuse est déposée sur le même support à proximité de la première, l'une de ces gouttes contient la cellule C, l'autre le réactif R, la réaction du réactif R avec la cellule C, et éventuellement sa transfection dans la cellule C, est déclenchée par la fusion des deux gouttes. Le déplacement et la fusion des gouttes peuvent être obtenus par vibration au sein du support, par déplacement électrophorétique des gouttes chargées électriquement ou par des pinces mécaniques ou optiques. Ils peuvent également être obtenus par une modification des propriétés de surface du support sous l'effet d'un champ électrique, magnétique, par un traitement optique ou thermique. Une telle variante est illustrée par la figure 2.

 . Selon une troisième variante, le réactif R est fixé au support S ou au film F, la cellule C est déposée sous forme d'une goutte aqueuse sur le support S et le réactif R est alors décroché du support S ou du film F afin de permettre sa réaction avec la cellule et éventuellement sa transfection dans la cellule. Cette variante est illustrée par les figures 3 et 7.

Dans la présente invention, le terme de transfection est utilisé pour désigner la pénétration d'une molécule d'un réactif, quel qu'il soit, dans une cellule.

 L'invention a également pour objet un dispositif permettant la mise en réaction d'un réactif R avec une cellule C, ce dispositif étant caractérisé en ce qu'il comporte :

- un support S comportant une surface sensiblement plane recouverte d'un film de séparation F permettant le passage des gaz et empêchant l'évaporation des gouttes aqueuses déposées sur le support S, F étant non miscible avec le réactif R,
- des moyens permettant le dépôt sur ladite surface et sous le film F, de gouttes aqueuses contenant la cellule C,
- une enceinte à atmosphère contrôlée dans laquelle est placé le support S de façon à permettre la survie de la cellule C.

Préférentiellement, le support S est constitué par une plaque qui peut être en silicium, en verre ou en polymère, comme par exemple en polyuréthane, en nylon, en polyester, en polyéthylène, en polypropylène, en polyfluorocarbène, en polyméthylméthacrylate (PMMA), en polycarbonate, en chlorure de polyvinyle (PVC), en polydiméthylsiloxane (PDMS) ou en polysulfone.

Selon l'invention, l'accrochage des gouttes sur le support se fait par capillarité, grâce aux forces de tension de surface. Préférentiellement, le support S présente une surface sensiblement plane comportant au moins un moyen destiné à la réception des gouttes aqueuses.

De préférence, le moyen destiné à la réception des gouttes aqueuses consiste en des zones de la surface sensiblement plane du support S d'une taille allant de $5 \mu\text{m}^2$ à 5mm^2 .

Selon une première variante, on peut prévoir que le support S présente sur sa surface plane un caractère hydrophobe et comporte une ou plusieurs zones hydrophiles constituant ledit moyen de réception. Selon une autre variante, on peut également prévoir que le support S comporte sur sa surface plane des cavités, d'une profondeur allant de 1 micron à 1 millimètre, et constituant ledit moyen de réception. On peut également prévoir que le support S soit une plaque munie d'excroissances de faible épaisseur, de 1 micron à 1 millimètre, disposées sur sa surface et destinées à favoriser l'accrochage des gouttes. Enfin, on peut prévoir que le support S soit une plaque munie d'au moins un fil, sur lequel viennent s'accrocher les gouttes. Le dépôt de deux gouttes sur le même moyen de réception va favoriser la fusion de ces deux gouttes et donc la réaction du réactif R avec la cellule C. De préférence, le support S présente sur sa surface plane un caractère hydrophobe et comporte une ou plusieurs zones hydrophiles constituant le moyen de réception. Pour

conférer à la surface plane du support un caractère hydrophobe, celle-ci est préférentiellement recouverte d'un matériau hydrophobe tel qu'un polyfluorocarbène, comme par exemple le polytétrafluoroéthylène ou Téflon ®, d'un silane comme par exemple le perfluorosilane. La zone hydrophobe du support peut consister en une structuration de surface dentelée à l'échelle nanométrique comme le « silicium noir »
5 utilisé en optique. Des exemples de lames commerciales de ce type sont les lames immunofluorescence 40 puits D2 mm super téflon, commercialisées par la société MERCK EUROLAB division POLYLABO. Encore plus préférentiellement, le support comporte en outre un second moyen de réception des gouttes superposé au
10 premier, comme par exemple une surface plane hydrophobe et des excroissances de faible épaisseur hydrophiles, ou une surface plane hydrophobe et des puits hydrophiles, ou une surface plane hydrophobe et un fil hydrophile.

Selon une variante de l'invention, le support est doté d'une surface dont les propriétés d'hydrophilie/hydrophobie peuvent varier sous l'influence d'un
15 paramètre tel que la température, un champ électrique, un champ magnétique, une irradiation. Le support peut ainsi être actif, pour faire évoluer les gouttes sur sa surface en utilisant les principes de la microfluidique en goutte. Cela revient à modifier dynamiquement les propriétés de surface du support (par exemple les variations en énergie/tension de surface) pour faire bouger les gouttes de manière contrôlée. Ainsi,
20 les gouttes de cultures cellulaires peuvent passer par différentes étapes de réactions conduites au sein du support : on peut faire fusionner deux gouttes qui se rapprochent (une avec le réactif et une autre avec les cellules par exemple).

Pour réaliser ce genre de support Shenderov *et al.* (« *Electrowetting-based actuation of liquid droplets for microfluidic applications* », Applied Physics
25 Letters, vol. 77, n°11, p. 1725-1726, septembre 2000) décrit l'utilisation de la modification des énergies de surface d'une couche hydrophobe, lors de l'application d'un champ électrique : la tension de surface diminue avec l'intensité du champ, la surface devient moins hydrophobe, voir hydrophile. Le contrôle et le mouvement du champ électrique permettent de déplacer les gouttes de liquides sur cette surface. Cette
30 méthode a été brevetée par la société Nanolytics (Shenderov *et al.* « *Actuators for microfluidics without moving parts* », n° US 6,565,727 ; 2003), mais sans l'utilisation de cultures cellulaires.

Une autre manière de modifier ces propriétés de surface consiste en la modification physico-chimique de la couche surfacique du support, toujours à l'aide d'un potentiel électrique. Par exemple, le changement de conformation d'une couche de SAM (« self-assembled monolayer », monocouche auto-assemblée, par exemple des thiols modifiés, comprenant au moins une extrémité hydrophile et une chaîne hydrophobe), démontré par Lahann et al. (« *A reversibly switching surface* », Science, vol. 299, p. 371-374, janvier 2003), permet de passer d'une conformation droite des molécules au sein de la couche superficielle, qui alors présente un caractère hydrophile, à une conformation courbée, dans laquelle elle présente un caractère hydrophobe.

De la même manière, on peut utiliser la température comme moyen de changer les propriétés de surface d'un support. Liang *et al.* ("*Preparation of Composite-Crosslinked Poly (N-Isopropylacrylamide) Gel Layer and Characteristics of Reverse Hydrophilic-Hydrophobic Surface*" Journal of Applied Polymer Science 72:1, 1999) décrit un polymère qui est hydrophile à faible températures (<30°C) et hydrophobe au-dessus. En intégrant un système de contrôle localisé de la température sous le substrat, on peut contrôler les propriétés de la surface.

On peut aussi mettre en place un support dont les propriétés de la couche surfacique change avec l'application ou non de lumière (champs électromagnétique). Ichimura *et al.* (« *Light-driven motion of liquids on a photoresponsive surface* », Science, vol. 288, p. 1624-1626, juin 2000) décrit une telle surface : une couche de polymère (calix[4]resorinarene) dont le groupe terminal (azobenzene) peut changer de conformation isomérique après une photoirradiation asymétrique. Lorsqu'on expose ces groupes cycliques en conformation *trans* (couche hydrophile) aux UV (365nm), ils passent en conformation *cis* (hydrophobe). La réaction est réversible en utilisant de la lumière bleue (436 nm). En éclairant de façon sélective et graduelle la couche de polymère, on peut déplacer des gouttes de liquide de manière contrôlée.

Selon une variante de l'invention, le réactif R est fixé au support S avant le dépôt de la goutte aqueuse contenant la cellule C. De tels dispositifs sont

connus de l'homme du métier pour d'autres utilisations : ce sont les puces à ADN telles que décrites par :

- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D.
Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns,
5 *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Dec. 8; 95(25): 14863-8;
- Haab B.B., Dunham M.J., Brown P.O.,
Protein microarrays for highly parallel detecting and quantitation of
specific proteins and antibodies in complex solutions,
10 *Genome Biol*. 2001 Jan 22; 2(2): RESEARCH 0004.1-0004.13;
- Livache T., Bazin H., Caillat P., Roget A., Electroconducting
polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon
chips, *Biosens Bioelectron*. 1998 Sep 15;13(6):629-34.

On peut appliquer le même principe à des molécules autres que des polynucléotides. Des puces à molécules sont décrites dans : Kuruvilla *et al.*, Glucose
15 signalling with small molecule microarrays, *Nature* (2002), 416 p. 653. Dans tous les cas, la molécule de réactif est d'abord accrochée sur la puce (par exemple par accrochage covalent sur une lame de verre). Selon la présente invention, la molécule peut éventuellement être décrochée après dépôt des gouttes aqueuses contenant des cellules sur la puce à molécules.

20 Le décrochage de la molécule de réactif peut être fait de façon connue par l'un des moyens suivants :

- photoclivage par des UV en utilisant un site de liaison du réactif au support qui soit photoclivable comme illustré par la figure 5.

Et dans le cas où le réactif est un polynucléotide uniquement :

25 - coupure de l'ADN double brin par des enzymes de restriction, ou par d'autres nucléases,

- modification de la stringence d'hybridation : un changement de concentration saline, de température ou de conditions Redox du milieu permet de séparer deux brins d'ADN.

30 Dans certains cas on prévoit que le réactif R reste fixé sur le substrat.

Selon l'invention, la surface sensiblement plane du support S est recouverte d'un film de séparation qui remplit trois fonctions :

- il prévient une fusion des gouttes aqueuses non désirée,
 - il empêche l'évaporation des gouttes aqueuses déposées sur le
- 5 support,
- il permet le passage des gaz, notamment O₂ et CO₂, ces deux dernières fonctions étant destinées à permettre la survie des cellules dans leurs gouttes.

Le film F peut être de différentes natures :

- il peut s'agir d'un liquide non miscible avec l'eau comme par
- 10 exemple une huile. Jusqu'à ce jour, on savait utiliser l'huile pour conserver certaines cellules, toutefois, elle n'avait jamais été utilisée pour effectuer des réactions sur des cellules. Parmi les huiles utilisables dans le procédé et le dispositif selon l'invention, on peut citer notamment les huiles minérales et les huiles de silicone. On peut
- 15 également utiliser comme liquide L un solvant organique non miscible avec les composés à traiter (cellules et réactifs), tel que par exemple l'octane. De préférence on utilise une huile minérale légère.

- il peut également s'agir d'un gaz comme de l'air saturé en
- humidité,
- il peut ensuite s'agir d'un film souple, solide, tel qu'un film en
- 20 PDMS ou polydiméthyl siloxane ou un film en nitrocellulose,

- il peut enfin s'agir d'un capot rigide alvéolé en matériau poreux, la
- taille des alvéoles étant adaptée pour pouvoir contenir la goutte de cellule(s) et éventuellement de réactif. Selon une variante de l'invention, le capot rigide alvéolé
- 25 peut être fonctionnalisé, dans chaque alvéole, par une molécule de réactif et constituer ainsi une puce à molécule ou une puce à nucléotide appelée à venir en contact avec le support sur lequel des gouttes de cellules ont été déposées de façon symétrique par rapport aux alvéoles. Cette variante de l'invention est illustrée par la figure 7.

Lorsque le film de séparation est un gaz ou un liquide, de façon

30 avantageuse, le dépôt des gouttes aqueuses contenant une ou plusieurs cellules ou un réactif sur le support S et sous le film de séparation se fait au moyen de fins

capillaires, comme illustré sur la figure 1. De préférence, ces capillaires sont reliés à une pompe ou pousse-seringue permettant de contrôler le volume des gouttes.

Les réactifs ou les cellules peuvent être également dispensés par un système classique comme ceux utilisés pour la fabrication des puces à ADN. On peut
5 citer par exemple les systèmes piézoélectriques permettant de comprimer une cavité et d'éjecter une goutte par une buse. On peut se reporter à ce sujet à N. Takada et *al.*, Proceeding of the SID, vol. 27/1, 1986, 31-35.

Préférentiellement, les gouttes éjectées passent à travers le film de liquide ou de gaz grâce à leur vitesse d'éjection et/ou par gravité, ce liquide ou ce gaz
10 étant plus léger que la solution à déposer. Lorsque le film de séparation est un film solide ou un capot rigide, celui-ci est déposé sur le support, après dépôt des gouttes aqueuses de cellules et éventuellement de réactifs par les mêmes moyens que décrit ci-dessus.

Le déplacement et la fusion des gouttes peuvent être obtenus par
15 vibration au sein du support, par déplacement électrophorétique ou électromagnétique des gouttes chargées électriquement ou par des pinces mécaniques ou optiques. Il peut également être obtenu par une modification des propriétés de surface du support provoquées par l'application d'un champ électrique, magnétique ou un traitement thermique ou optique.

20 Préférentiellement, le support S du dispositif est mobile, de façon à permettre son déplacement d'un premier moyen de dépôt à un second moyen de dépôt, et éventuellement à d'autres moyens de dépôt. Le support S peut dans certains cas être constitué d'un film solide fixé à des rouleaux à ses deux extrémités, les rouleaux étant munis de moyens de bobinage de façon à permettre le déplacement du film et donc le
25 déplacement des gouttes qui ont été déposées dessus.

Généralement, le procédé selon l'invention prévoit le déplacement du support S après le dépôt sur le support S de la première série de gouttes, qu'il s'agisse des gouttes de cellules ou des gouttes de réactif.

Selon l'invention le support S est placé dans une enceinte à
30 atmosphère contrôlée dont la température, l'hygrométrie et la teneur en CO₂ sont ajustées de façon à permettre la survie des cellules.

De tels dispositifs sont notamment des étuves à atmosphère contrôlée. La température dans un tel dispositif peut varier de 35 à 42°C, une température préférée se situant entre 36,5 et 37,5°C. La variation de température peut notamment être utilisée pour induire des différenciations cellulaires.

5 Le taux de CO₂ est préférentiellement maintenu entre 3 et 5%. Le taux d'oxygène O₂ est préférentiellement celui de l'air ambiant.

Par exemple, on peut prévoir de maintenir les cellules dans des gouttes aqueuses sur le support S dans une étuve à 37°C, avec 95% d'air, 5% de CO₂ et 97% d'humidité.

10 On peut prévoir que la totalité du dispositif réactionnel : support, film de séparation, moyens de dépôt, moyens de détection, etc. soient placés dans l'enceinte à atmosphère contrôlée.

On peut également prévoir que seuls les supports sur lesquels ont été déposées les gouttes de cellules et le film de séparation soient placés dans une
15 enceinte à atmosphère contrôlée.

De façon avantageuse, on peut prévoir que les gouttes aqueuses contenant une ou plusieurs cellules, un tissu cellulaire ou un réseau cellulaire, comportent un milieu de culture.

En effet, l'établissement de cultures de cellules dépend de l'aptitude
20 des cellules à maintenir leur prolifération et donc des conditions indispensables à leur croissance.

Avantageusement, on prévoit que les gouttes aqueuses de cellules comprennent du MEM ou « minimal essential medium » commercialisé par la société GIBCO BRL sous la référence Cat. No. 12000-022.

25 Le milieu de culture peut également contenir d'autres constituants tels que du sérum de veau, un ou plusieurs antibiotiques destinés à contrôler la stérilité du milieu, comme par exemple de la pénicilline.

On peut également prévoir d'utiliser dans le milieu de culture des agents chimiques qui induisent la différenciation des cellules, comme par exemple la
30 bromodéoxyuridine.

On peut également prévoir que les gouttes aqueuses dans lesquelles les cellules C sont en culture soient gélifiées, à l'aide de tout agent gélifiant connu, comme par exemple de l'agar ou de la gélatine.

De façon avantageuse, les gouttes aqueuses contenant la ou les
5 cellules ou le tissu cellulaire ou le réseau de cellules, et/ou les gouttes aqueuses contenant le réactif, comportent un ou plusieurs constituants destinés à favoriser la transfection, comme par exemple des liposomes. De tels agents de transfection sont décrits notamment dans les documents WO 01/20015 et WO 98/33932.

D'autres moyens destinés à favoriser la transfection peuvent
10 également être employés dans le dispositif de l'invention, tels que : l'électroporation ou la microprécipitation. Ces méthodes de transfection, bien connues de l'homme du métier, sont décrites notamment sur <http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW4/MG43.html>.

Selon l'invention, on peut en outre prévoir que le dispositif
15 comporte :

- des moyens permettant d'apporter de l'énergie à une ou plusieurs gouttes déposées sur le support ;
- des moyens de traitement optique d'une ou plusieurs gouttes déposées sur le support ;
- 20 - des moyens d'application d'un champ magnétique ou d'un champ électrique à une ou plusieurs gouttes déposées sur le support, notamment pour permettre l'électroporation ;
- des moyens de détection focalisés sur une ou plusieurs gouttes déposées sur le support.

25 Les moyens utilisés dans les dispositifs selon l'invention seront préférentiellement reliés à un dispositif de contrôle permettant l'automatisation du dispositif et du procédé selon l'invention.

Parmi les moyens d'apport d'énergie, on peut citer en particulier des moyens de traitement thermique, qui peuvent consister par exemple en un dispositif
30 chauffant susceptible d'être placé à proximité du support S ou fixé à ce support et destiné à porter les gouttelettes à une température appropriée. Par exemple, le moyen

de chauffage peut consister en des fils conducteurs de l'électricité servant également de moyen de réception des gouttes.

Les moyens de détection sont notamment des dispositifs destinés à mesurer la fluorescence ou la radioactivité d'une ou plusieurs gouttes ou des cellules
5 contenues dans une ou plusieurs gouttes.

Les moyens de traitement optique sont notamment des moyens de traitement aux rayons ultra-violets, ces derniers étant connus pour induire une réticulation entre des brins complémentaires d'ADN et entre ADN et protéines.

L'utilisation du dispositif et/ou du procédé selon l'invention présente
10 de nombreux avantages : on peut utiliser de très petites quantités de matériaux : une seule cellule par goutte permet de réaliser une expérience de transfection. On peut travailler avec des volumes de gouttes très petits, inférieurs à 1 micro litre, de préférence de 0,1 à 1000 nanolitres contenant 1 à 500 cellules, encore plus préférentiellement de 0,1 à 10 nanolitres contenant 1 à 10 cellules. Avantageusement,
15 on travaille sur des gouttes contenant de 1 à 100 cellules. On peut également prévoir de travailler sur des volumes plus importants, notamment supérieurs au microlitre (10 à 100µl, contenant 500 à 100 000 cellules). Ce procédé permet également d'utiliser de petites quantités de réactif. Le film de séparation F permet de contrôler les échanges gazeux du milieu de culture de la cellule et sa stérilité. Il permet aussi de séparer des
20 gouttes dont on ne souhaite pas qu'elles réagissent ensemble. Enfin, ce procédé permet d'améliorer l'efficacité de la transfection : chaque cellule engagée dans le procédé peut être transfectée. Les cultures de cellules sous forme de gouttes sous le film de séparation peuvent se conserver au moins 24 heures et jusqu'à plusieurs jours sans que l'on observe de modifications notables de leur activité cellulaire (sans influence
25 notable sur la prolifération et la croissance des cellules).

Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent également de réaliser des batteries de réactions :

Plusieurs gouttes aqueuses comprenant chacune au moins une cellule peuvent être déposées sur le support S, lesdites gouttes étant isolées les unes
30 des autres. De préférence, chacune de ces gouttes est placée dans un moyen de réception distinct. Toutes les cellules peuvent être identiques, mais on peut également prévoir de placer des cellules différentes (au moins deux sortes de cellules différentes)

dans les différentes gouttes. Des gouttes contenant le ou les réactifs sont déposées, à proximité de chaque goutte contenant une cellule, de façon à permettre la fusion d'une goutte contenant le réactif approprié avec la goutte contenant la cellule visée. Pour la réalisation de batteries de réactions, on prévoit avantageusement un support
5 comprenant des moyens de réception disposés de façon régulière sous forme de matrices, de façon à permettre l'automatisation du procédé.

De façon avantageuse, le support et les capillaires destinés à déposer les gouttes aqueuses de cellules et de réactifs sont reliés à des moyens de contrôle de façon à permettre l'automatisation du procédé.

10 Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent donc de réaliser simultanément et de façon automatisée un grand nombre de réactions d'un réactif sur une cellule en faisant varier la nature du réactif et de la cellule, tout en travaillant sur des volumes extrêmement réduits.

Parmi les cellules qu'il peut être intéressant d'étudier par ce procédé,
15 on peut citer notamment :

- des cellules primaires,
- des hybridomes,
- des lignées de cellules : les cellules peuvent se perpétuer éternellement et former ainsi des lignées,
- 20 - des cellules souches : elles sont obtenues à partir d'un prélèvement chez l'animal ou à partir de biopsies,
- un morceau de tissu cellulaire (les cellules ne sont pas individualisées)
- des mélanges des différents types de cellules énoncés ci-dessus.

25 Les cellules sont cultivées en milieu de culture (aqueux) de façon connue. On peut également cultiver des cellules hétérogènes pendant plusieurs jours et utiliser ce mélange.

Selon une variante de l'invention, lorsque toutes les cellules à mettre en réaction sur un même support sont identiques on peut procéder de la façon
30 suivante : le support est une plaque hydrophobe comportant des zones hydrophiles, on l'immerge dans une solution aqueuse contenant les cellules puis on la sort de cette solution en laissant le liquide en excès s'écouler. Les gouttes du milieu contenant les

cellules sont retenues dans les zones hydrophiles. Cette étape est suivie du dépôt d'une couche de film de séparation F et du dépôt des gouttes contenant un réactif ou d'autres cellules. Suivant la nature du film F (fluide ou solide), celui-ci est déposé avant ou après le dépôt des gouttes de réactif ou d'autres cellules.

5 Parmi les réactifs R susceptibles d'être utilisés dans le procédé et le dispositif selon l'invention, on peut citer :

Des molécules chimiques de toutes natures, notamment des molécules organiques naturelles, des molécules issues de synthèse organique et de synthèse combinatoire, des molécules extraites d'échantillons biologiques et des
10 molécules extraites d'échantillons biologiques modifiées par synthèse. On peut citer notamment les polynucléotides : les molécules d'ARN, simple brin et double brin, notamment les molécules d'ARNsi (petit ARN pour l'interférence) ; les molécules d'ADN, simple brin et double brin ; les molécules de PNA (de l'anglais « peptidic nucleic acid » ou acide nucléique peptidique) qui sont des chimères peptide-acide
15 nucléique ; les ribozymes ; les ARN interférences double brin ou les protéines et les peptides. Parmi les protéines, on peut citer tout particulièrement les facteurs de transcription.

Les molécules de réactif peuvent être formulées en solution prête à être déposée. Elles peuvent également être préparées directement après dépôt sur le
20 support, par exemple par synthèse, notamment par synthèse organique, *in situ*, ou par transcription *in vitro* dans la goutte. Des molécules de type prion peuvent aussi être obtenues en goutte par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (de l'anglais "polymerisation chain reaction") peptidique avant leur transfection dans les cellules. Lorsque l'on utilise des molécules d'acides nucléiques, leur préparation peut être faite
25 par PCR nucléique. Comme il a déjà été exposé ci-dessus, le réactif peut également être fixé au support.

Lorsque l'on emploie comme réactif de l'ADN, avantageusement celui-ci est sous forme précipitée. De façon connue, on peut par exemple utiliser le phosphate de calcium. La précipitation de l'ADN peut également être faite dans la
30 goutte aqueuse déposée sur le support par fusion avec une goutte du réactif approprié.

Selon une variante du dispositif et du procédé selon l'invention, on peut prévoir de faire plusieurs dépôts successifs destinés à être fusionnés :

On peut prévoir de déposer successivement plusieurs réactifs destinés à transfecter une même cellule et observer leurs effets cumulés ;

On peut également prévoir de déposer plusieurs gouttes de cellules et les faire fusionner, de façon à reconstituer un réseau cellulaire de cellules identiques
5 ou différentes afin de se rapprocher au plus près de conditions rencontrées *in vivo*. Par exemple, on peut reconstituer des réseaux de neurones à l'échelle de quelques cellules par la rencontre de cellules gliales et de neurones pour les faire communiquer au sein d'une même goutte, ou des interactions entre les différents types de cellules qui constituent la peau afin de mimer le comportement de celle-ci à l'échelle cellulaire.

10 On peut également reconstituer un tissu cellulaire destiné à mimer le comportement de l'épiderme en cultivant ensemble au sein d'une même goutte des kératinocytes sur un tapis de collagène. On peut également cultiver ensemble des cellules souches de la peau en présence de cellules du follicule pileux afin d'étudier leurs interactions.

15 Par exemple, on peut utiliser la transfection de réactifs dans un premier type de cellules de façon à déclencher une réaction cellulaire, telle que la production d'une protéine recombinante puis faire réagir cette première population cellulaire avec une population cellulaire d'un autre type par fusion avec une autre goutte.

20 Selon une variante de l'invention illustrée par la figure 8, on peut également prévoir que le support soit muni de moyens de séparation permettant de séparer deux types de cellules distincts mais autorisant le passage de petites molécules entre ces cellules. Un tel moyen de séparation est destiné à mimer une barrière biologique, telle que par exemple la barrière existant entre le sang et les cellules
25 cervicales. De tels moyens de séparation sont avantageusement disposés au niveau des moyens de réception, sur le support. Pour leur mise en œuvre, on prévoit de déposer une goutte aqueuse comprenant au moins une cellule d'un premier type d'un côté du moyen de séparation et une goutte aqueuse comprenant au moins une cellule d'un second type de l'autre côté du moyen de séparation. La fusion des gouttes de part et
30 d'autre du moyen de séparation permet une communication entre les cellules par l'intermédiaire de molécules susceptibles de diffuser au travers du moyen de séparation. Cette communication peut alors être étudiée par tous moyens, notamment

par l'ajout de réactifs sous forme de goutte aqueuse avant ou après la fusion des gouttes cellulaires. Par la transfection automatisée de ces gouttes, il est possible d'analyser le rôle biologique des facteurs transfectés dans une multicouche biologique.

Les moyens de séparation utilisables selon cette variante de l'invention sont des membranes artificielles telles que par exemple un filtre en nitro-cellulose, du silicium percé de nano-trous, un buvard en papier, un filtre en tissu ; on peut également prévoir d'utiliser un gel solide tel qu'un gel d'agarose, du collagène ou de la gélatine.

Le dispositif et le procédé selon l'invention permettent d'automatiser l'expression de protéines recombinantes obtenues par l'entrée d'ADN codant dans les cellules, de réaliser le criblage de molécules nucléiques destinées à modifier (bloquer ou au contraire augmenter) l'expression de gènes dans les cellules et de rechercher des séquences génomiques promotrices. Cette invention permet aussi d'étudier les interactions entre des cellules de différents types, cette interaction étant déclenchée par le mélange des gouttes. Le dispositif et le procédé selon l'invention permettent d'obtenir une vue globale des effets biologiques de la réaction de molécules de toutes sortes avec des cellules, et notamment de l'entrée automatisée de molécules de toutes sortes dans des cellules.

Avantageusement, la détection globale des phénotypes cellulaires engendrés par l'entrée des molécules dans les cellules sera réalisée à l'aide de molécules marquées, c'est-à-dire de molécules qui peuvent être détectées sans porter atteinte à l'intégrité du milieu qui les contient. On pense notamment aux marqueurs fluorescents, radioactifs ou à tout autre moyen de marquage connu de l'homme du métier.

L'un des avantages du procédé et du dispositif selon l'invention réside dans le fait que la totalité des étapes de transfection et de manipulation des interactions cellulaires se fait en phase liquide qui favorise la culture cellulaire en milieu nutritif et les réactions enzymatiques.

De façon générale, le procédé et le dispositif selon l'invention présentent les avantages suivants :

- amélioration de l'efficacité de la transfection, par rapport à la transfection faite de façon classique en puits de culture ;
- plusieurs types cellulaires peuvent être testés sur un même support au cours d'une même séquence de réactions ;
- 5 - plusieurs types de molécules peuvent être testées sur un même support au cours d'une même séquence de réactions ;
- les réactifs peuvent être obtenus directement dans la goutte avant fusion ;
- tous les réactifs sont préparés de façon indépendante et en parallèle
- 10 à la préparation des cultures de cellules.

Parmi les applications du dispositif et du procédé selon l'invention, on peut citer notamment la recherche de séquences à activité anti-sens : On connaît, par Dean *et al.*, Current Opinion in Biotechnology, 12, 622 (2001), l'utilisation de petites séquences d'ADN ou d'ARN pour bloquer la synthèse d'une protéine dans les

15 cellules et chez l'animal. Cette thérapie génique a été utilisée pour tester de nouveaux agents anti-viraux chez l'homme. Cependant, cette approche biotechnologique a échoué maintes fois, l'utilisation d'un ou de plusieurs oligonucléotides ne permettant pas de bloquer l'expression d'une protéine. Lors de ces essais, en l'absence de moyens de criblage appropriés, les séquences des oligonucléotides utilisées étaient choisies un

20 peu au hasard, parmi les séquences génomiques accessibles. Les oligonucléotides employés ne présentaient pas une affinité suffisante pour l'ARN cible et ne permettaient pas de bloquer sa traduction dans les cellules. Les molécules d'ADN synthétiques étant toxiques pour la cellule eucaryote, on cherche à en utiliser des quantités minimales. Pour bloquer l'expression d'un gène cible dans une cellule, il faut

25 intervenir à quatre niveaux :

- trouver la position de liaison optimale sur l'ARN, position qui correspond généralement à une portion moins repliée dans la structure quaternaire de l'ARN ;
- trouver des séquences oligonucléotidiques présentant une haute
- 30 affinité pour l'ARN ;
- trouver des séquences oligonucléotidiques capables de pénétrer dans une cellule eucaryote ;

- conserver les oligonucléotides non dégradés dans la cellule pendant plusieurs jours.

Les deux premières étapes peuvent être réalisées à l'aide d'une puce classique à oligonucléotides sur laquelle est testée l'hybridation d'une famille d'oligonucléotides à de l'ARN cible rendu fluorescent (on peut par exemple se référer aux travaux de Olejnik *et al.*, NAR, 26, 3572 (1998)). Le procédé selon l'invention va permettre de tester la pénétration des oligonucléotides dans la cellule et leur stabilité.

Pour mettre en évidence la séquence optimale permettant de réduire l'expression d'une protéine cible dans une cellule, on utilisera des oligonucléotides modifiés, tels que par exemple des dérivés phosphorothioate, cette modification conférant à l'oligonucléotide concerné une résistance aux nucléases de plusieurs jours.

Les molécules anti-sens peuvent aussi être constituées par des duplexes d'ARN, appelées ARN interférences (ARNi), qui s'hybrident aux ARN messagers en formant des triples hélices d'ARN (pour cette approche, on peut se référer à Elbashir *et al.*, Nature, 411, 494-498 (2001)). Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent également de cribler des séquences d'ARNi longues (plasmidiques) et courtes (synthétiques).

Une autre application du procédé et du dispositif selon l'invention concerne la production automatisée de protéines recombinantes en gouttes. La transfection automatique devrait permettre de tester l'expression de différents fragments d'ADN codant ainsi que celle de différents mutants de ce même ADN. L'expression automatisée de protéines recombinantes sur les dispositifs selon l'invention peut être une alternative à la puce à protéines. Il n'est alors plus nécessaire de produire les protéines, de les purifier et de les accrocher sur un support solide, les protéines sont fabriquées *de novo* sur le dispositif.

Une autre application du procédé et du dispositif de l'invention est la préparation et le criblage d'ARNsi. Les RNAsi ('RNA small interference' ou petit ARN pour l'interférence) sont des molécules double brin d'ARN capables de bloquer spécifiquement et efficacement l'expression de gènes dans des cellules en culture et chez l'animal. Les RNAsi ont été élues 'molécules de l'année 2002' par le magazine Science : ces molécules pourraient permettre en particulier des thérapies innovantes en cancérologie et en virologie. Elles ont aussi déjà permis de caractériser la fonction de

gènes jusqu'alors inconnue (T.Tuschl, Nature Biotechnology, vol.20, May 2002, p.446-448)

Pour fabriquer ces RNAsi, quatre voies ont été répertoriées. La première utilise la chimie, les deux brins de l'ARNsi sont fabriqués chacun dans un synthétiseur d'acides nucléiques puis sont associés après synthèse (molécule synthétique fabriquée à partir de phosphoramidite ARN décrit dans : S.M.Elbaschir *et al.*, Nature, 411, 24 May 2001, 494-498). La deuxième utilise *in vitro* une ARN polymérase, chaque brin de l'ARNsi est fabriqué de façon complémentaire par rapport à un brin d'ADN puis les deux brins sont associés après synthèse (exemple : kit commercial pSilencer commercialisé par la société Ambion et kit commercial HiScrib commercialisé par la société NEB Biolabs). La troisième utilise la synthèse *in vivo* dans les cellules eucaryotes ou dans les bactéries, les deux brins sont fabriqués en utilisant les RNA polymérases présentes *in vivo*. La quatrième utilise des ARN longs, simples ou double brins, (produits *in vitro* ou *in vivo*) qui seront transformés en petites molécules (RNAsi) par les nucléases des cellules transfectées (R.Agami, Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6, 829-834).

Dans la présente invention c'est la deuxième voie qui peut être appliquée, celle qui s'attache à fabriquer des RNAsi à partir de molécules d'ADN contenues dans un tube. On utilise cette voie en particulier car elle est moins onéreuse que celle qui consiste à fabriquer les RNAsi chimiquement. Il a aussi été rapporté que la structure des RNAsi synthétisés *in vitro* est différente de celle des RNAsi obtenus chimiquement, elle permet d'obtenir une affinité plus importante dans le cas de l'hybridation des RNAsi obtenus *in vitro* avec les ARN cibles des cellules transfectées. Ainsi le blocage de l'expression des gènes est meilleur avec des RNAsi obtenus *in vitro* qu'avec des RNAsi chimiques : meilleur efficacité et besoin de concentrations d'ARNsi moins élevées .

Cette variante de l'invention s'appuie sur un procédé de fabrication des RNAsi sur un substrat solide. La présente invention propose de fabriquer des RNAsi en goutte à l'aide de deux matrices d'ADN contenant une séquence promotrice pour une ARN polymérase (de type SP6 ou T7 par exemple) et d'utiliser ce formatage en goutte pour transfecter, par fusion de gouttes, les molécules de RNAsi double brin

dans des cellules cultivées en goutte sur un substrat solide. Les matrices d'ADN peuvent être fixées de façon covalente ou non covalente sur le substrat solide.

Afin d'optimiser le blocage de l'expression d'un gène, il est nécessaire de tester plusieurs séquences d'ARNsi le long du gène (au moins une dizaine) et un intérêt considérable se tourne vers le criblage systématique de plusieurs gènes (par exemple plus de 5600 gènes bloqués chez le vers de terre : S.S.Lee et al., Nature Genetics, 33, January 2003, 40-48).

Certaines qualités de séquences des RNAsi ont déjà été proposées concernant le pourcentage de nucléotides GC par exemple, ou le Tm de l'oligonucléotide correspondant, ou encore la taille de la molécule (21mer). Cependant rien ne remplace l'expérience, le criblage est nécessaire, non seulement pour trouver la séquence optimale pour bloquer l'expression d'un gène mais aussi pour déterminer sa concentration ainsi son temps d'action dans la culture cellulaire.

Pour réaliser ces différents criblages phénotypiques, il est possible d'utiliser des puits de plastiques (format 96 trous ou 384), cependant nous avons montré que l'efficacité de transfection est meilleure dans des cultures de cellules en goutte (une concentration 5 fois plus faible de RNAsi a été utilisée pour obtenir la même efficacité de transfection et de blocage de l'expression d'un gène dans des cultures cellulaires en goutte plutôt que dans des cultures cellulaires en puits). De plus l'analyse phénotypique du blocage de l'expression d'un gène est très pertinente lorsque les cellules ont été cultivées en goutte sur une lame de verre : les cellules après leur transfection sont fixées sur la lame de verre en petits tas distincts, les niveaux d'expression de gènes sont révélés par immunocytochimie fluorescente et analysés directement par scanner (détection directe du nombre de photons émis par les cellules marquées par les anticorps).

Applications potentielles :

- Caractérisation de la fonction de gènes (en particulier dans le cas de gènes 'inaccessibles' par KO de souris transgéniques, les souris KO meurent avant la naissance)

- Caractérisation de la fonction de plusieurs gènes dans plusieurs types de cellules : criblage à haut débit nécessaire. C'est le cas de l'analyse *in vivo* de délétion génique.
- Cancérologie : analyse du rôle de gènes dans l'angiogénèse ainsi que dans la propagation de certains cancers. De plus, bloquer les gènes indispensables à la réparation cellulaire, va permettre de rendre certaines cellules chimio-sensibles. La chimio-sensibilité peut être analysée sur puce.
- Virologie. La propagation du virus VIH a été bloquée *in vivo* grâce à l'utilisation de RNasi (N.S.Lee *et al.*, Nature biotechnology, vol.19, May 10 2002, 500-505)

EXEMPLES

Matériel et méthodes employés dans les exemples :

Détection

La détection de la transfection par une molécule fluorescente se fait en deux temps :

- par une vue globale des points fluorescents,
- par analyse des points individuels pour créer une image complexe.

La vue globale de la fluorescence se fait par détection bi-paramétrique :

- de la fluorescence de l'iodure de propidium = témoin de la présence d'une cellule,
- de la fluorescence de la 'green fluorescent protein' GFP = marqueur fluorescent vert témoin de l'expression de la protéine GFP.

L'image obtenue est ensuite analysée grâce à des systèmes de quantification du signal et qui permettent de combiner les fluorescences de séries de points de mesures.

- analyse de la fluorescence des gouttes : les cellules peuvent être analysées vivantes en gouttes sous la couche d'huile. Pour ces expériences, nous avons utilisé un microscope Olympus ® BX 51M et un microscope confocal Leica ®.

- analyse de la fluorescence des cellules fixées : après fixation des cellules par le PFA ou paraformaldéhyde (voir application n°1) la lame de verre contenant les cellules recombinantes est utilisée comme une lame d'histologie. Il est possible de réaliser des expériences de marquage radioactif et de marquage fluorescent. (voir application n°5.2). La fluorescence totale de la lame peut être analysée à l'aide d'un microscope classique. Nous avons aussi utilisé un scanneur classiquement utilisé dans des expériences de puce à ADN (Scanner : GenePix 4000B, commercialisé par la société Axon Instrument). La précision dans ce genre d'appareil est de 5 μ m, il est donc possible de visualiser une cellule à l'aide d'une dizaine de pixels.

La figure 4 illustre un exemple d'application du dispositif selon l'invention : l'expression d'une protéine recombinante dans une suspension de cellules gliales et de l'activation d'une suspension de neurones.

Sur une lame de verre (support S) dans un récipient contenant une huile minérale légère (film F) commercialisée par le Société Sigma, on injecte :

- une goutte de cellules en suspension contenant en milieu aqueux (quelques nanolitres) une centaine de cellules gliales ;
- une goutte aqueuse contenant de l'ADN sous forme de sel de phosphate de calcium (quelques picomoles) ;
- une goutte de cellules neuronales en suspension dans l'eau.

On fait d'abord fusionner les deux premières gouttes par déplacement mécanique des 2 gouttes à l'aide de l'extrémité d'une pipette pour obtenir la goutte G₁ de cellules transfectées. La cellule gliale exprime ainsi une protéine recombinante. On fait alors fusionner cette goutte G₁ avec la goutte G₂ contenant les neurones en suspension. Ceux-ci sont alors activés.

I. Transfection d'oligonucléotides, criblage de séquences capables de bloquer l'expression de gènes spécifiques

Dans cet exemple, nous avons cherché à sélectionner des séquences d'oligonucléotides capables de bloquer l'expression d'un gène d'intérêt, appelé cible dans cet exemple. Pour mesurer l'activité antisens de ces oligonucléotides nous avons utilisé des lignées cellulaires stables exprimant la protéine cible en fusion avec le

variant E-GFP (Green Fluorescent Protein de type E, commercialisée par la Société Clontech). Ces lignées sont des outils précieux pour évaluer les performances des différents oligonucléotides : l'activité antisens est mesurée par diminution de la fluorescence des protéines reportrices. Afin de trouver un oligonucléotide qui a une

5 activité antisens exceptionnelle, il est indispensable de réaliser le criblage d'au moins 50 oligonucléotides de séquences différentes pour un même gène. Au cours de ce criblage dans les cellules, nous avons recherché en particulier l'oligonucléotide qui a la plus grande affinité pour l'ARN cible et le plus grand pouvoir de pénétrance dans la cellule.

10 Expériences réalisées avec le dispositif selon l'invention :

La transfection par le phosphate de calcium a été choisie car elle est très efficace : en utilisant des oligonucléotides marqués avec du cy5 (Cyanine 5), ces oligonucléotides étant commercialisés par la Société Eurogentec, 70% de cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney) et 80% de cellules COS (Chinese Ovary

15 Sarcoma) deviennent fluorescentes après un jour de culture (fluorescence mesurée par cytométrie de flux). D'autres méthodes de transfection faisant intervenir la formation de gouttelettes de lipide autour de l'ADN peuvent aussi être utilisées.

Expérience 1a : transfection par fusion de gouttes

Pour un gène cible, nous choisissons 50 oligonucléotides de

20 séquences différentes. Nous nous sommes intéressés au blocage de l'expression de la sous unité bêta 2 de la caséine kinase. Les oligonucléotides sont synthétisés sous forme de résidus de 18 à 21 nucléotides de long, et contiennent des liaisons phosphorothioate capables de limiter leur dégradation par les nucléases. Chacun de ces oligonucléotides est précipité sous forme de phosphate de calcium (réaction

25 classique : 1 µl d'oligonucléotide resuspendu dans l'eau à 1 mM est mélangé à 100 µl de chlorure de calcium 0.25 M et à 100 µl de tampon HBS (Chen et Okayama, Biotechniques 1988, 6, 632-638). Pour réaliser la transfection dans une boîte de plastique contenant 1 ml d'huile minérale, une goutte de 1 µl de chacun de ces 50 précipités est fusionnée avec une goutte de 10 µl de cellules dans leur milieu de

30 culture (DMEM commercialisée par la Société Gibco) (environ 5000 cellules

fibroblaste 3T3). Les gouttes sont placées au fond de la boîte sur le support plastique sous l'huile.

L'activité antisens est mesurée après 2 jours de culture par diminution de la fluorescence de la GFP exprimée en tandem avec la protéine cible dont on cherche à bloquer l'expression. La fluorescence des 50 gouttes est observée simultanément au microscope. Cette expérience est réalisée plusieurs fois en parallèle afin de s'assurer de la pertinence des résultats. Il est important de faire ces 50 tests en parallèle afin de comparer l'activité antisens de chacun des oligonucléotides. Pour observer la diminution de la fluorescence de la protéine cible, il est possible soit d'observer les cellules transfectées vivantes au microscope, soit de fixer les cellules au paraformaldéhyde (classiquement 4% de PFA). Pour la fixation des cellules, le paraformaldéhyde est ajouté à volume égal à la goutte cellulaire pendant 10 minutes puis l'ensemble gouttes + huile est rincée au PBS deux fois.

Expérience 1b : photoclivage des oligonucléotides de la puce cellulaire et transfection

Cette expérience est illustrée par la figure 3.

Nous avons utilisé une puce classique à ADN, la transfection est obtenue après décrochage des oligonucléotides du support solide. Les cellules sont cultivées à proximité des dépôts d'oligonucléotides sur la lame de verre.

Les oligonucléotides (commercialisés par la société Eurogentec) sont accrochés par leur extrémité 5' aminée sur une lame silanisée (par exemple une lame Surmodics commercialisée par la société Motorola). L'ADN des dépôts est complexé aux sels de phosphate de calcium (selon le même principe de précipitation de l'ADN que celui décrit dans l'application 1a) et gardé humide sur la lame. Les cellules adhérentes 3T3 sont ensuite déposées en goutte à la surface des spots d'oligonucléotides, l'ensemble est gardé sous 1 ml d'huile minérale pendant un jour en incubateur cellulaire : les gouttes peuvent être formées à la surface des dépôts d'ADN ou bien formées à l'aide d'une surface composite (hydrophile et hydrophobe, lame ProLabo décrite dans l'application n°5). Le décrochage des oligonucléotides, complexés au calcium phosphate et situés sous les cultures cellulaires en goutte, est obtenu comme illustré sur la figure 5 par illumination de la lame par des UV à 365 nm

qui permettent de couper la liaison photoclivable introduite en 5' des oligonucléotides (en 3' du site aminé).

exemple d'oligonucléotide accroché, puis décroché par photoclivage, puis finalement transfecté dans des cellules HEK 293 adjacentes :

5	Nom	Séquence	Composition	Modification
	huGAPDH203F_PC_cy5	SEQ ID NO:1 AACGACCACTTTGTCAAGCT	20mers + site PC + site Cy5 + amine en 5'	PC en 5' – Cy5 en 3' (dT)

II- Transfection d'ADN codant et expression de protéines recombinantes

Dans cet exemple, nous nous sommes intéressés à l'expression d'une famille de protéines dans les cellules eucaryotes. Pour l'instant, en biologie moléculaire, l'expression de protéines recombinantes est obtenue puits par puits, par transfection d'un ADN codant sur un tapis cellulaire. Par la transfection parallélisée, nous allons obtenir simultanément l'expression de plusieurs ADN codant pour plusieurs protéines. Ce dispositif permet de tester plusieurs constructions dans des vecteurs d'expression d'un ou de plusieurs gènes.

Expériences réalisées avec le dispositif selon l'invention :

Application 2a : Expression de protéines recombinantes dans un type de cellule.

Expression d'une famille d'ADN codant pour les kinésines humaines à l'aide du dispositif selon l'invention :

Les kinésines forment une famille de protéines présentant des propriétés biochimiques similaires, ce sont des protéines motrices associées aux microtubules. Ces protéines se trouvent dans toutes les cellules eucaryotes. Elles permettent de transformer l'hydrolyse d'ATP en énergie mécanique et jouent un rôle fondamental dans le transport des organelles, des ARNm et des complexes protéiques le long des microtubules. Elles peuvent se déplacer du côté positif des microtubules (N-kinésines) ou du côté négatif (C-kinésines). Elles participent aussi aux mouvements chromosomiques pendant la mitose et la méiose et jouent un rôle

important lors de la division cellulaire. On peut notamment se reporter aux publications suivantes :

Ref.1 : Compton, D.A. (1999). *New tools for the mitotic toolbox. Science* 286, 913-914. Miki, H., Setoy, M., Kaneshira, K., Hirokawa, N. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7004-7011.

Ref.2 : Wade, R.H., Kozielski, F. (2000). *Structural links to kinesin directionality and movement. Nature Structural Biology* 7, 456-460.

Ref.3 : Kozielski, F., Svergun, D.I., Zaccari, G., Wade, R.H., Koch, M. (2001). *The overall conformation of conventional kinesins studied by small-angle x-ray and neutron-scattering. J. Biol. Chem.* 276, 1267-1275.

Avec le dispositif selon l'invention, nous avons obtenu l'expression d'une vingtaine d'ADN codant pour ces kinésines en utilisant des plasmides d'expression permettant d'exprimer en tandem la protéine d'intérêt et la GFP (pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, commercialisé par la société InVitrogen). La transfection a été réalisée comme lors de l'application 1a : la fusion des gouttes est obtenue sous 1 ml d'huile, 10 ng de plasmide précipité au phosphate de calcium est mis en contact avec une goutte de 10 µl contenant environ 5000 cellules HEK 293 (human embryonic kidney). Après 1 jour de transfection, les gouttes de cellules HEK 293 sont fluorescentes par expression de la protéine GFP dans les cellules. Il a été possible d'observer ces gouttes cellulaires sous huile au microscope confocal et de localiser précisément la compartimentation cellulaire pour chacune des kinésines fluorescentes exprimées dans ce dispositif.

application 2b : expression de protéines recombinantes dans un dispositif selon l'invention en utilisant plusieurs types cellulaires.

Expression recombinante du facteur Pax6 par des cellules gliales : 10 ng de plasmide contenant en tandem les gènes codant pour le facteur Pax6 et pour la GFP (pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, commercialisé par la société InVitrogen) précipité au phosphate de calcium (voir précipitation de l'ADN au phosphate de calcium dans l'application 1a) est mis en contact avec une goutte de 10 µl contenant environ 5000 cellules gliales (cellules gliales radiales de cortex, post natal, 2 divisions). Après 1 jour de culture, la goutte G1 de cellules gliales est fusionnée à une autre goutte G2 de 10 µl contenant 5000 cellules corticales (culture primaire corticale

isolée de cortex cérébral post natal). Les cellules gliales recombinantes de G1 exprimant le facteur Pax6 sont par exemple capable d'induire la neurogenèse des cellules astrocytcales contenues dans G2.

Cette application est importante pour le criblage de nouveaux
5 médicaments à potentiel neurotrophique, par exemple dans la recherche de composés capables de régénérer des neurones dopaminergiques dans des cerveaux altérés par la maladie de Parkinson.

On peut par exemple se reporter à la publication suivante :

ref. 4 : Heins et al., *Glial cells generate neurons: the role of the*
10 *transcription factor Pax6, Nature Neuroscience (2002) 5, 308 - 315*

III- Transfection avec des virus ou des prions en milieu confiné

Le système selon l'invention peut être facilement confiné : la formation des gouttes peut être réalisée mécaniquement sans intervention d'un utilisateur, et ces dernières peuvent être conservées à l'abri des contaminants par
15 maintien sous une couche d'huile pendant plusieurs jours. La transfection de virus peut être obtenue de deux façons :

- par fusion d'une goutte de cellules eucaryotes et d'une goutte de virus
- par contamination de cellules par des échantillons cellulaires 'à
20 risque'

Dans les gouttes il est possible de produire le virus ou l'agent pathogène (amplification et encapsulation) ou de le détecter (concentration biologique et réaction antigène-anticorps).

IV- Mise en évidence d'une séquence génomique promotrice

25 Les séquences promotrices, une partie du génome peu connue :

La technologie des gènes reporteurs et plus précisément des constructions " région promotrice-activité reportrice " a été largement utilisée pour la caractérisation des régions régulatrices en amont des gènes. Les microtechnologies permettent aujourd'hui d'accroître considérablement le nombre de promoteurs étudiés.
30 La régulation transcriptionnelle de ces régions peut être observée en temps réel grâce à l'utilisation d'un gène reporteur codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein). La

fluorescence de cette protéine peut être observée sans avoir à lyser les cellules. Les variations de fluorescence vont nous permettre d'étudier les cinétiques de la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de promoteurs en parallèle et en temps réel.

5 Expériences réalisées avec le dispositif selon l'invention :

L'activité reportrice de gènes connus et induits par les radiations ionisantes (par exemple, les gènes p53, c-myc) a été utilisée pour valider la puce et le modèle expérimental. Les séquences d'intérêt en amont des gènes P53 et c-myc ont été amplifiées puis clonées en amont du gène de la GFP dans le vecteur phrGFP
10 (Genentech). La transfection a été réalisée comme lors de l'application 1a : la fusion des gouttes est obtenue sous huile, 10 ng de plasmide (phrGFP contenant les séquences d'ADN promotrices) précipité avec le phosphate de calcium est mis en contact avec une goutte de 10 µl contenant environ 5000 cellules de kératinocytes humains. Par sa localisation dans la peau, le kératinocyte représente un des types
15 cellulaires les plus exposés aux irradiations *in vivo*. Après 1 jour de transfection, les gouttes des kératinocytes sont fluorescentes par expression de la protéine GFP dans les cellules. La mesure de l'activité reportrice GFP est faite par lecture globale de fluorescence par microscopie couplée à une caméra CCD (Charge Coupled Device).

V- Criblage de nouveaux médicaments en gouttes :

20 Remarque générale : dans l'industrie pharmaceutique, le criblage a été réalisé pendant les dix dernières années sur des cibles protéiques recombinantes. Dans plusieurs exemples (tels que les récepteurs au glutamate) on s'est aperçu que le récepteur recombinant présent dans la membrane plasmique isolée n'était pas tout à fait dans sa conformation biologique, les récepteurs ont en particulier besoin d'être co-
25 exprimés avec des protéines chaperones qui sont présentes dans les synapses. On peut par exemple se reporter à la publication suivante :

Ref 5 : Ohnuma et al .Gene expression of PSD95 in prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia.Neuroreport. (2000) 11(14):3133-7.

Pour obtenir un résultat plus précis et plus proche du comportement
30 *in vivo*, le criblage d'un ensemble de composés chimiques est désormais envisagé sur

cellules vivantes. Dans ce cas le criblage se fait à l'aide d'un test dynamique au cours duquel les cellules sont maintenues en vie. Exemple de référence:

ref.6: *Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells, Sato et al, Nature Biotech (2002) 20, 287-294).*

5

Modèle d'étude : réalisation des gouttes de cellules

Cette expérience est illustrée par la figure 6. Les cellules vivantes sont déposées en gouttes homogènes sur un support solide. La réalisation de ce dispositif cellulaire peut être facilitée par l'utilisation d'une surface composite (hydrophile et hydrophobe), lame de verre commercialisée par la société ProLabo, recouverte d'un film de téflon ® et contenant des puits circulaires hydrophiles de 3 mm de diamètre. Un grand nombre de gouttes homogènes peut être réalisé par simple trempage du support dans une suspension cellulaire. Les gouttes sont ensuite recouvertes d'une couche d'huile minérale pour éviter leur dessèchement et favoriser la survie cellulaire jusqu'au test de criblage. Les gouttes cellulaires peuvent être conservées sur ce type de support pendant plusieurs jours dans un incubateur destiné à la culture cellulaire. Pour cribler n-molécules différentes, n-gouttes de composés à tester sont déposées individuellement sur les gouttes cellulaires préalablement formées.

On peut également prévoir que des composés chimiques soient greffés sur la surface du support (comme pour les oligonucléotides, dans l'application 1b) puis décrochés ensemble (par exemple par illumination UV). L'insertion d'un site photoclivable dans les molécules peut être obtenue par chimie combinatoire.

Un test simple de criblage dynamique (exemple : FRET = fluorescence resonance by electron transfer ou résonance de fluorescence par transfert d'électrons) peut être utilisé pour mettre en évidence les propriétés de certains de ces composés.

5.1.Exemple de criblage : mesure de l'activité du récepteur adrénergique :

30

On peut se reporter à la publication suivante : *ref. 7 : Ghanouni et al, Agonist induces conformational changes in the G protein coupling domain of the beta2 adrenergic receptor, PNAS (2001) 98, 11, 5997-6002.*

Il est possible d'attacher une fluorescéine à l'une des cystéines
5 (cys265) du récepteur beta2 adrenergic pour rendre cette protéine fluorescente lorsqu'elle est insérée dans la membrane cellulaire. Pour tester les propriétés adrénergiques d'un nouveau médicament potentiel, nous mettons en contact sous huile une goutte de 100 nl contenant la molécule en solution et une goutte de 1 µl contenant 500 cellules recombinantes dans leur milieu de culture exprimant le récepteur
10 adrénergique recombinant et muté. L'induction de changement de conformation du récepteur par un agoniste est observée au microscope par une baisse de l'intensité de fluorescence de la fluorescéine contenue dans le récepteur adrénergique.

5.2. Exemple de criblage : immunocytochimie sur cellules

15 recombinantes :

Après transfection, les cellules recombinantes peuvent être fixées sur le support à l'aide de PFA (voir application n°1). Dans le cas de l'expression recombinante de la sous unité bêta 2 de la caséine kinase avec le dispositif selon l'invention, nous avons utilisé un anticorps pour révéler l'expression de la protéine
20 recombinante dans les cellules 3T3. (anticorps commercialisé par la société Upstate Biotechnology : Rabbit polyclonal anti-CK2 beta antibody). On peut se reporter à la publication *ref.8 : Alexandre E. Escargueilet al., Mitotic Phosphorylation of DNA Topoisomerase II by Protein Kinase CK2 Creates the MPM-2 Phosphoepitope on Ser-1469, J. Biol. Chem. (2000), 275, Issue 44, 34710-347183.*

25

VI- Variante de la puce à molécules :

La figure 7 illustre cette variante : des gouttes de cellules dans un milieu de culture sont déposées sous forme de matrice sur un support en téflon. Un capot en PDMS sur lequel sont greffées des molécules organiques d'une banque de
30 criblage et comportant des alvéoles d'un volume sensiblement égal à celui des gouttes est posé sur le support. L'espacement des gouttes a été prévu pour une exacte

correspondance entre le support et le capot. Les molécules sont décrochées du capot par tout traitement approprié de façon à transfecter des cellules.

VII- Déplacement de gouttes dans un champ électrique :

Le déplacement de gouttes sur un support dont la tension de surface varie avec l'application d'un champ électrique a été testée : sur le support testé, de nature hydrophobe à l'exception de plots hydrophiles, la tension de surface diminue avec l'intensité du champ, la surface devient moins hydrophobe, voir hydrophile. Le contrôle et le mouvement du champ électrique permettent de déplacer les gouttes de liquides sur cette surface. On a opéré le mouvement de gouttes de cellules dans un champ électrique de 1000V (une goutte de 5 μ L contenant une suspension cellulaire de cellule Hela à 10⁶ cellules /ml, une goutte de 5 μ l : bleu trypan dans du PBS (1/5))

Le bleu trypan est un marqueur de viabilité cellulaire. Cette réaction de mélange de bleu trypan et de cellules a permis de vérifier que le champ électrique n'a pas tué les cellules car le % de cellules colorées ne dépassait pas 2%.

VIII- Transfection automatisée

La réalisation de transfections sur puces de cellules en goutte, effectuées manuellement sur des lames commerciales, peut être transférée sur un automate de fabrication de micro batteries et permettre ainsi un mode particulier de transfection automatisée d'ADN. Pour cela, trois séries de dépôts successifs de trois gouttes sont réalisées sur la même puce, donc sur un même plot des lames commerciales, les gouttes vont fusionner pour permettre le mélange des réactifs et des cellules.

Expérimentation :

1. Préparation des échantillons:

On prépare une microplaque de 96 puits contenant les différents échantillons à déposer : les solutions d'ADNs, le milieu de transfection, les milieux cellulaires.

2. Dépôt des ADNs (oligonucléotides simple brin, produits de PCR ou plasmides) à transfecter dans les cellules:

Le robot prélève dans la plaque de 96 puits 2 μ L d'une solution contenant un des ADNs et il dépose ensuite une goutte de 10 nL sur un des plots de la

lame. Et ainsi de suite pour les différents ADNs. Nous avons donc déposé 10nL d'oligonucléotide à la concentration 10nM (oligo: 5'SEQ ID NO:2 CGGAGGCGATGGTGTGGA 3' - 20mer marqué en 5' par du CY3) et 10nL d'une solution de plasmide codant pour la protéine GFP (pEGFP-C1, Clontech) à la concentration de 1mg/ml. La figure 9 est une photographie représentant la plaque sur laquelle ont été déposées les trois premières gouttes.

3. Dépôt de la solution de transfection sur les plots d'ADN à transférer :

Pour cela, une goutte de 0.2µl de 'siPORT' (Ambion), dilué au 1/20 dans du PBS (protocole du fournisseur) est déposée sur chacun des plots et mélangée aux solutions d'ADN préalablement déposées.

4. Dépôt des cellules:

Nous avons déposé une goutte de 1µl contenant 10^3 cellules HeLa (concentration initiale de 10^6 cellules /ml) sur chacun des plots contenant déjà les ADNs et le siPORT.

Après dépôt des cellules, les lames sont mises dans une boîte de Pétri contenant du PBS (pour éviter l'évaporation du milieu cellulaire). Elles sont ensuite transférées dans un incubateur à cellules (37°C, 5%CO₂) pendant 48 heures pour permettre l'expression de la protéine EGFP.

Après cette étape de culture, les cellules sont fixées dans une solution de paraformaldehyde (4% dans du PBS) pendant 20 minutes puis rincées deux fois au PBS. Les lames sont ensuite montées dans du PBS, puis la fluorescence est observée au microscope.

L'observation des cellules au microscope Olympus BX52 montre une fluorescence diffuse dans le cytoplasme pour la transfection avec l'oligo Cy3. La fluorescence est d'abord plus intense dans le noyau puis elle diffuse dans le cytoplasme pour les cellules transfectées avec la GFP. Les témoins négatifs (sans cellule ou sans ADN) ne montrent pas de fluorescence.

REVENDECATIONS

1°) Procédé de mise en réaction d'un réactif R avec au moins une cellule C, ledit procédé étant caractérisé en ce que :

- la cellule C est déposée sur un support S comportant une surface sensiblement plane, sous forme d'une goutte aqueuse sur ladite surface,
- la surface sensiblement plane du support S sur laquelle a été déposée la goutte aqueuse contenant la cellule C est recouverte par un film de séparation F, permettant le passage des gaz et empêchant l'évaporation des gouttes aqueuses déposées sur le support S, F étant non miscible avec le réactif R.
- la réaction entre le réactif R et la cellule C est déclenchée par l'introduction du réactif R dans la goutte aqueuse contenant la cellule C.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'accrochage des gouttes sur le support S se fait par capillarité.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou de la revendication 2, caractérisé en ce que le support S est constitué par une plaque d'un matériau choisi parmi le silicium, le verre ou un polymère.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le support S présente sur sa surface plane au moins un moyen destiné à la réception des gouttes aqueuses.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'une goutte aqueuse contenant la cellule C est déposée sur le support S, une seconde goutte aqueuse contenant le réactif R est injecté, à l'aide de tout ou moyen d'injection approprié, directement dans la goutte contenant la cellule C.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'une première goutte aqueuse est déposée sur le support S puis une seconde goutte aqueuse est déposée sur le même support à proximité de la première, l'une de ces gouttes contient la cellule C, l'autre le réactif R, la réaction du réactif R avec la cellule C est déclenchée par la fusion des deux gouttes.

7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le réactif R est fixé au support S ou au film F, la cellule C est déposée sous forme d'une goutte aqueuse sur le support S et le réactif R est alors décroché du support S ou du film F afin de permettre sa réaction avec la cellule.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le film de séparation F est un liquide choisi parmi les huiles et les solvants organiques.

9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le film de séparation F est choisi parmi les huiles minérales et les huiles de silicone.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le film de séparation F est de l'air saturé en humidité.

11°) Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le film de séparation F est un film souple, solide.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le film de séparation F est en polydiméthylsiloxane ou en nitrocellulose.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le film de séparation F est un capot rigide alvéolé en matériau poreux.

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que le dépôt des gouttes aqueuses contenant une ou plusieurs cellules ou un réactif sur le support S se fait au moyen de fins capillaires.

15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisé en ce que le dépôt des gouttes aqueuses contenant une ou plusieurs cellules ou un réactif sur le support S se fait au moyen d'une buse.

16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comporte une étape de déplacement du support S après le dépôt sur le support S de la première série de gouttes.

17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que les cultures de cellules sous forme de gouttes aqueuses sont conservées au moins 24 heures.

18°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que plusieurs gouttes aqueuses comprenant chacune au moins une cellule sont déposées sur le support S, sous le film de séparation F, lesdites gouttes étant isolées les unes des autres.

19°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'une goutte contient de 1 à 100 cellules

20°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 18 et 19, caractérisé en ce que l'on place des cellules différentes dans les différentes gouttes.

21°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 18 et 19, caractérisé en ce que l'on place des cellules identiques dans les différentes gouttes.

5 22°) Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le support est une plaque hydrophobe comportant des zones hydrophiles et que l'étape d'injection des gouttes aqueuses contenant des cellules est remplacé par l'immersion de la plaque dans une solution aqueuse contenant les cellules.

10 23°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisé en ce que les molécules de réactif sont préparées directement après dépôt sur le support, par un procédé choisi parmi la synthèse *in situ*, la transcription *in vitro* dans la goutte, la réaction de polymérisation en chaîne peptidique et nucléique.

24°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que le réactif est une molécule d'ADN.

15 25°) Procédé selon la revendications 24, caractérisé en ce que l'ADN est sous forme précipitée, notamment sous forme de phosphate de calcium.

26°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que le réactif est facteur de transcription.

20 27°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, caractérisé en ce que l'on dépose successivement plusieurs réactifs destinés à réagir avec une même cellule.

28°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 27, caractérisé en ce que l'on dépose plusieurs gouttes aqueuses renfermant des cellules et on fait fusionner ces gouttes.

25 29°) Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'on dépose des cellules gliales et des neurones pour les faire communiquer au sein d'une même goutte.

30 30°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 29, caractérisé en ce que l'on fait réagir des réactifs dans un premier type de cellules de façon à déclencher une réaction cellulaire, telle que la production d'une protéine recombinante puis on fait réagir cette première cellule avec une cellule d'un autre type par fusion avec une autre goutte.

31°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 dans lequel le support comporte des moyens de séparation, caractérisé en ce que l'on dépose une goutte aqueuse comprenant au moins une cellule d'un premier type d'un côté du moyen de séparation et une goutte aqueuse comprenant au moins une cellule d'un second type de l'autre côté du moyen de séparation puis que l'on opère la fusion des gouttes cellulaires.

32°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 31, caractérisé en ce que le réactif est choisi parmi les molécules marquées, notamment les marqueurs fluorescents et radioactifs.

10 33°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 32, caractérisé en ce que la cellule est choisie parmi : des cellules primaires, des hybridomes, des lignées de cellules, des cellules souches, un morceau de tissu cellulaire, et leurs mélanges.

34°) Dispositif permettant la mise en réaction d'un réactif R avec une cellule C, ce dispositif étant caractérisé en ce qu'il comporte :

- un support S comportant une surface sensiblement plane recouverte d'un film de séparation F permettant le passage des gaz et empêchant l'évaporation des gouttes aqueuses déposées sur le support, F étant non miscible avec le réactif R,
- des moyens permettant le dépôt sur ladite surface et sous le film F, de gouttes aqueuses contenant la cellule C,
- une enceinte à atmosphère contrôlée dans laquelle est placé le support S de façon à permettre la survie de la cellule C.

35°) Dispositif selon la revendication 34, caractérisé en ce que le support S est constitué par une plaque d'un matériau choisi parmi le silicium, le verre ou un polymère.

36°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 et 35, caractérisé en ce que le support S présente sur sa surface plane au moins un moyen destiné à la réception des gouttes aqueuses.

37°) Dispositif selon la revendication 36, caractérisé en ce que le moyen destiné à la réception des gouttes aqueuses consiste en des zones de la surface plane du support S d'une taille allant de $5 \mu\text{m}^2$ à 5mm^2 .

38°) Dispositif selon la revendication 36 ou la revendication 37, caractérisé en ce que le support S présente au moins l'une des caractéristiques a) à d) ci-dessous :

a) le support S présente sur sa surface plane un caractère hydrophobe et comporte une ou plusieurs zones hydrophiles constituant le moyen de réception ;

b) le support S comporte sur sa surface plane des cavités, d'une profondeur allant de 1 micron à 1 millimètre constituant le moyen de réception ;

c) le support S est une plaque munie d'excroissances d'épaisseur allant de 1 micron à 1 millimètre, disposées sur sa surface et destinées à favoriser l'accrochage des gouttes ;

d) le support S est une plaque munie d'au moins un fil, sur lequel viennent s'accrocher les gouttes.

39°) Dispositif selon la revendication 38 dans lequel le support S présente sur sa surface plane un caractère hydrophobe et comporte une ou plusieurs zones hydrophiles, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un second moyen de réception des gouttes superposé au premier.

40°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 39, caractérisé en ce que les moyens permettant le dépôt des gouttes aqueuses sur le support S consistent en de fins capillaires.

41°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 40, caractérisé en ce que les moyens permettant le dépôt des gouttes aqueuses sur le support S consistent en un système piézoélectrique muni d'une buse.

42°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 41, caractérisé en ce que le support S du dispositif est mobile.

43°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 42, caractérisé en ce que le support S est constitué d'un film solide fixé à des rouleaux à ses deux extrémités, les rouleaux étant munis de moyens de bobinage de façon à permettre le déplacement du film et donc le déplacement des gouttes qui ont été déposées dessus.

44°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 43, caractérisé en ce qu'il comporte en outre au moins un moyen choisi parmi :

- des moyens permettant d'apporter de l'énergie à une ou plusieurs gouttes déposées sur le support ;

- des moyens de traitement optique d'une ou plusieurs gouttes déposées sur le support ;

5 - des moyens d'application d'un champ magnétique ou d'un champ électrique à une ou plusieurs gouttes déposées sur le support ;

- des moyens de détection focalisés sur une ou plusieurs gouttes déposées sur le support ;

- des moyens destinés à favoriser la transfection.

10 45°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 44, caractérisé en ce que les moyens utilisés dans le dispositif sont reliés à un dispositif de contrôle permettant son automatisation.

 46°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 45, caractérisé en ce que le support comprend des moyens de réception disposés de façon régulière sous forme de matrices.

15 47°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 33 à 45, caractérisé en ce que le support est muni de moyens de séparation permettant de séparer deux types de cellules distincts mais autorisant le passage de petites molécules entre ces cellules.

20 48°) Dispositif selon la revendication 47, caractérisé en ce que les moyens de séparation sont disposés au niveau des moyens de réception, sur le support.

 49°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 48, caractérisé en ce que les gouttes aqueuses contenant une ou plusieurs cellules comportent un milieu de culture.

25 50°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 49, caractérisé en ce que le support est doté d'une surface dont les propriétés d'hydrophilie/hydrophobie peuvent varier sous l'influence d'un paramètre tel que la température, un champ électrique, un champ magnétique, une irradiation.

30 51°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour réaliser simultanément et de façon automatisée un grand nombre de réactions d'un réactif sur une cellule en faisant varier la nature du réactif et de la cellule.

52°) Utilisation selon la revendication 51, pour réaliser le criblage d'un ensemble de composés chimiques sur des cellules vivantes.

53°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour étudier des systèmes cellulaires choisis parmi : les réseaux
5 de neurones, l'épiderme.

54°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour étudier l'action sur une cellule d'un réactif choisi parmi : les molécules d'acides nucléiques, les protéines, les peptides, les molécules d'acide nucléique peptidique.

10 55°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour l'expression de protéines recombinantes.

56°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour réaliser le criblage de molécules nucléiques destinées à modifier l'expression de gènes dans les cellules.

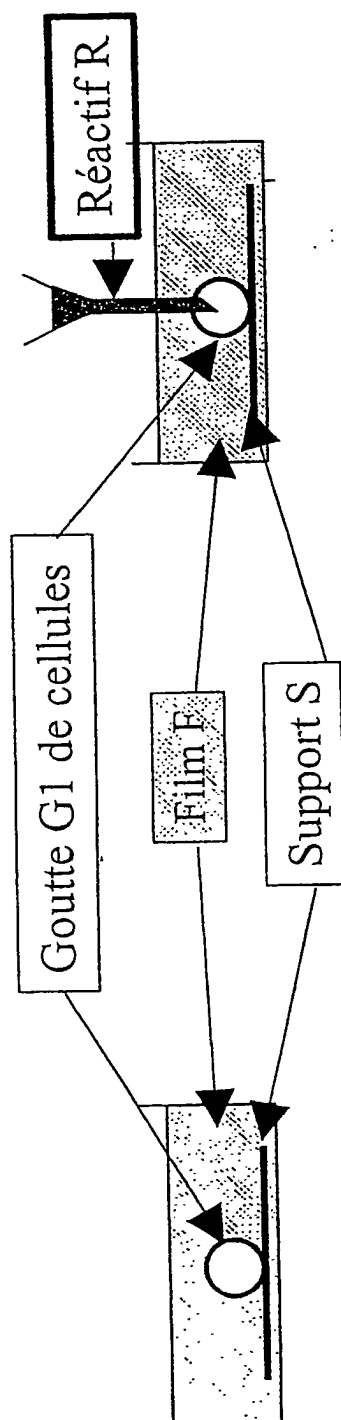
15 57°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour rechercher des séquences génomiques promotrices.

58°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour étudier les interactions entre des cellules de différents types.

20 59°) Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications 34 à 50 pour préparation et le criblage d'ARNsi.

1 / 8

Figure 1: transfection par injection de gouttes : R dans G1



A.. Goutte G1 sur support S

B. Injection de réactif R dans G1

Figure 2: transfection par fusion de gouttes: G1 + R

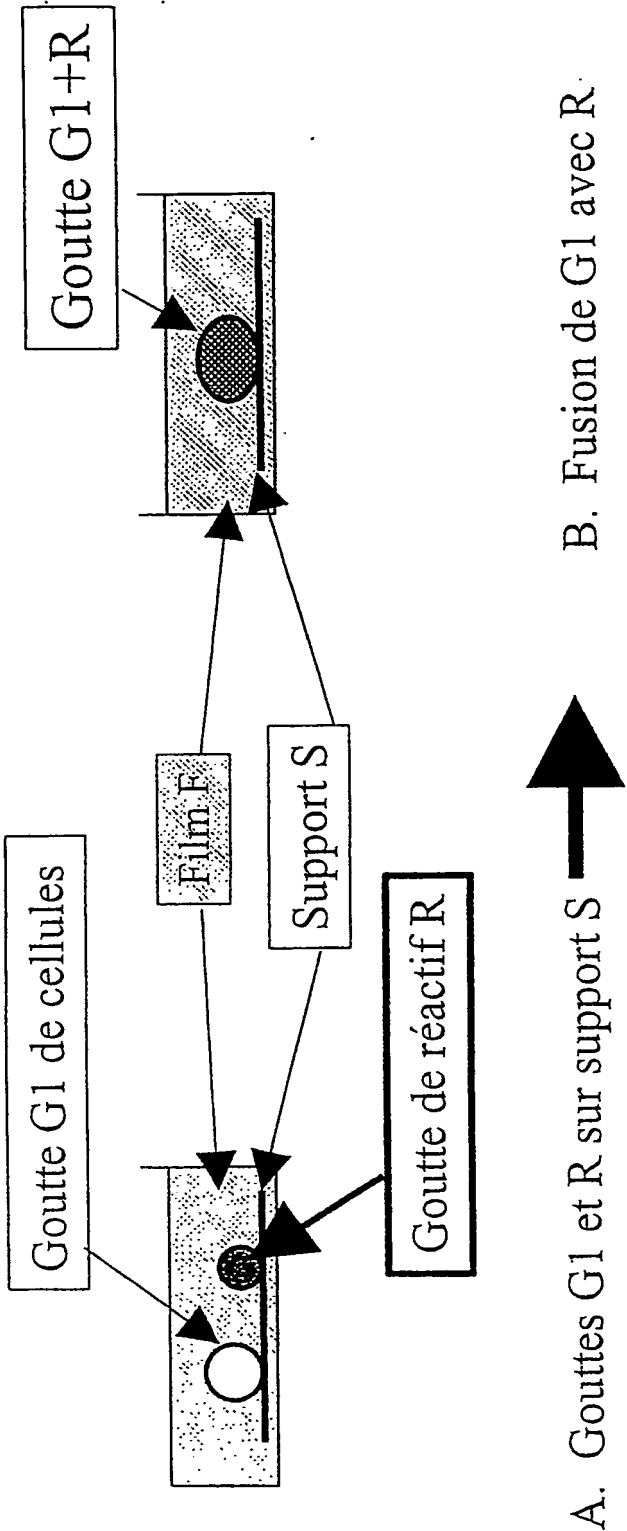


Figure 3: transfection en goutte G1 par décrochage de réactif R

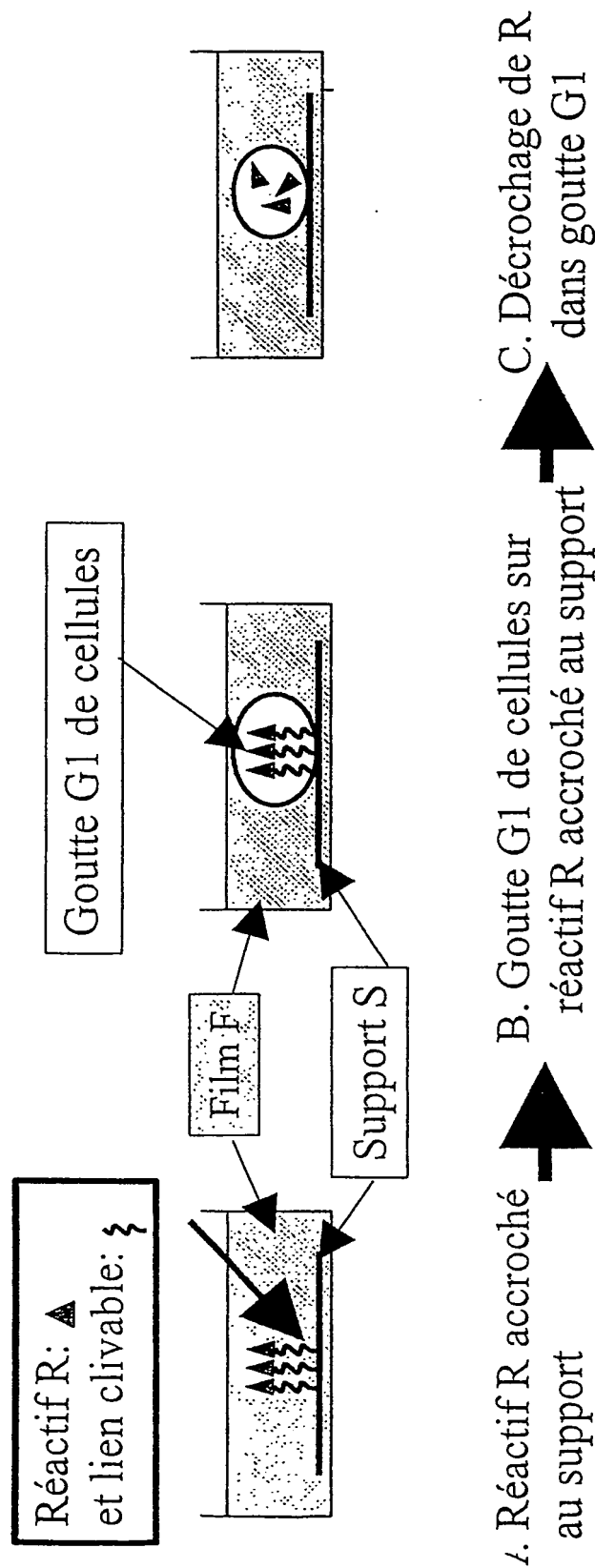


Figure 4: fusion de gouttes cellulaires G1+G2 après transfection
Exemple de l'expression d'une protéine recombinante dans une suspension de cellules gliales et de l'activation d'une suspension de neurones

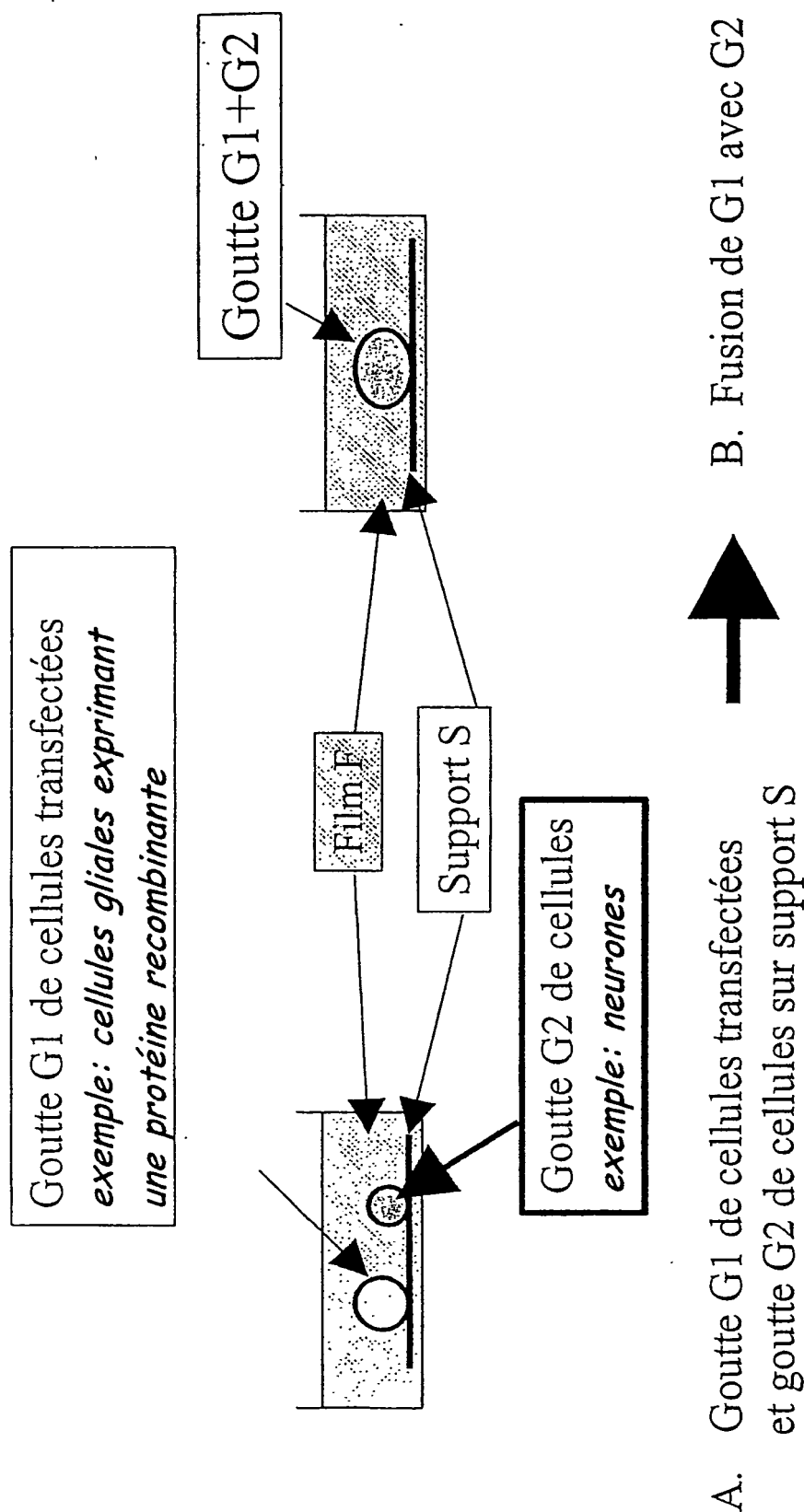
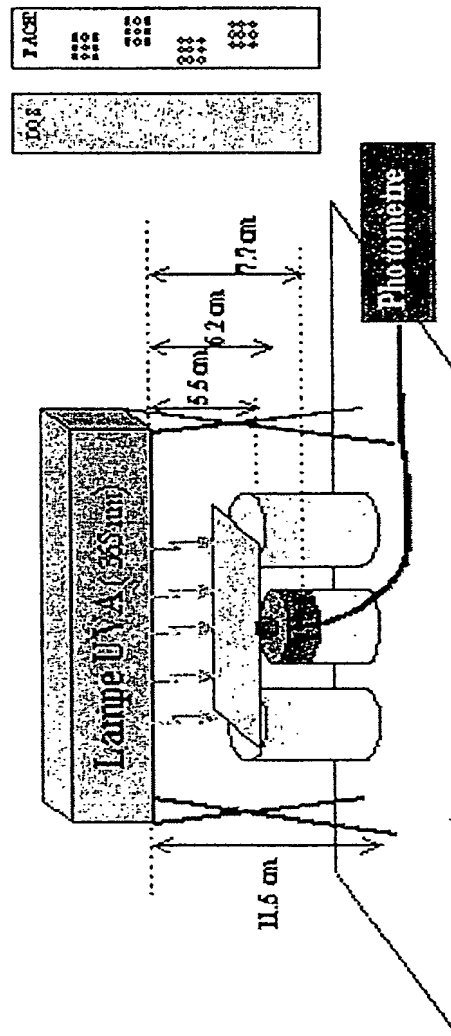


Figure 5: dispositif de photoclivage



6/8

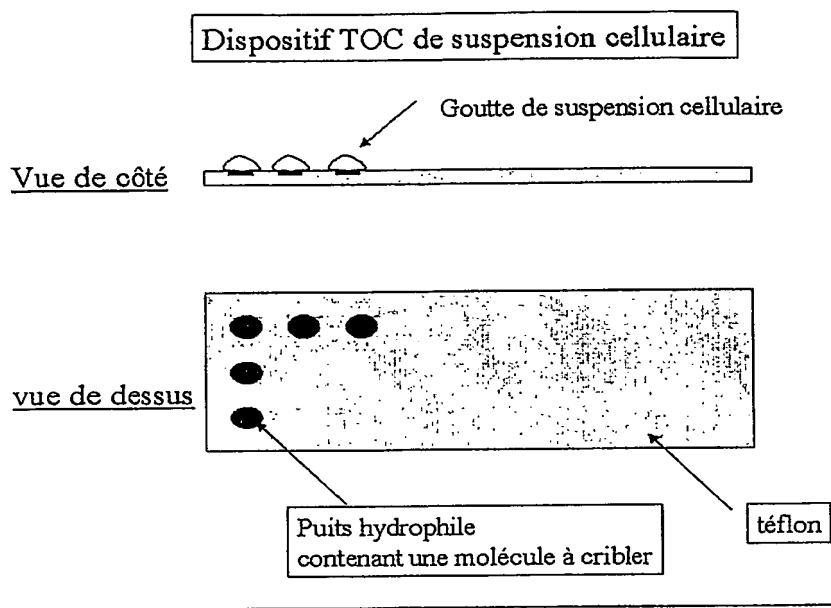


Figure 6

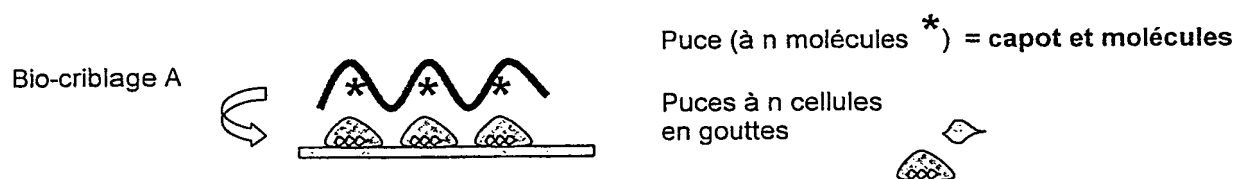
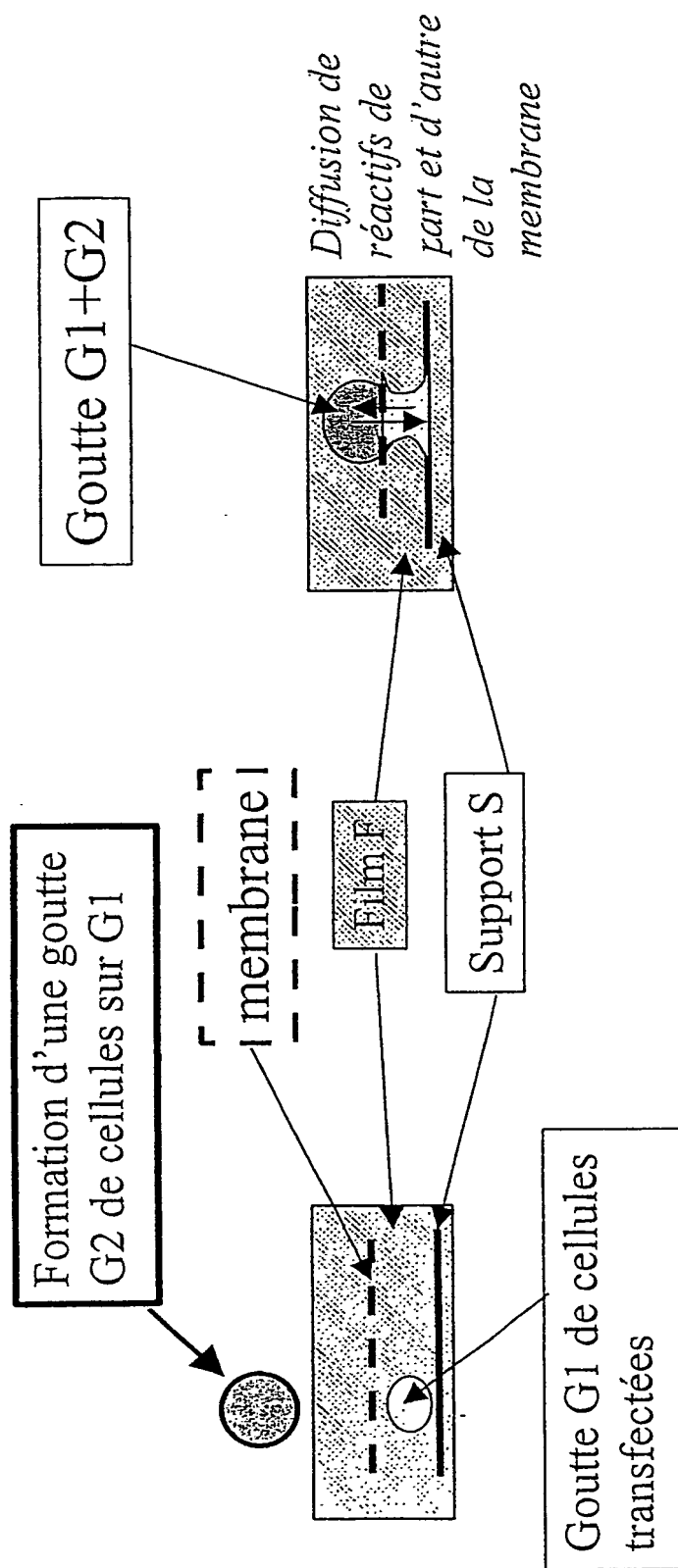


Figure 7

7 / 8

Figure 8: membrane entre deux gouttes cellulaires G1 et G2



A. Membrane déposée sur goutte G1 de cellules et formation d'une goutte G2 de cellules

B. Fusion de G1 avec G2

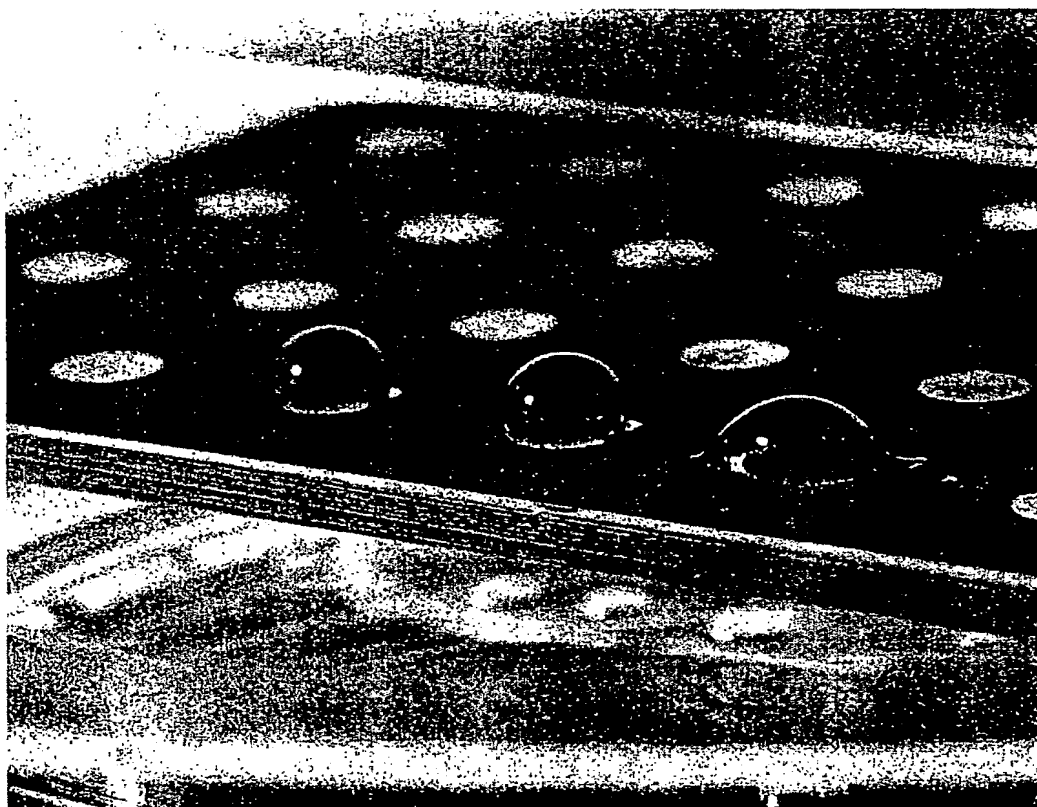


FIGURE 9

263s84.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> PROCEDE ET DISPOSITIF POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES DANS DES CELLULES

<130> VCstsF263/84PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nucleotide

<400> 1

aacgaccact ttgtcaagct

20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nucleotide

<400> 2

cggaggcgat ggtgttgga

19

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.